

EXPRESSION VECTOR OF MODIFIED Bax PEPTIDE

Patent number: JP2002355034
Publication date: 2002-12-10
Inventor: KANWA TOSHIHIRO; USUI KAZUHIRO; OTA SHIGEO
Applicant: JAPAN SCIENCE & TECH CORP
Classification:
- international: C12N15/09; A61K35/76; A61K38/00; A61P35/00
- european:
Application number: JP20010133334 20010427
Priority number(s): JP20010133334 20010427

Report a data error here

Abstract of JP2002355034

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for inhibiting the proliferation of tumor cells by using an expression vector by constructing the vector capable of expressing a modified Bax peptide, and introducing the gene encoding the modified Bax peptide into an in vivo tumor cell. **SOLUTION:** The expression vector is constructed by creating the gene encoding the modified Bax peptide obtained by removing the BH3 region from a gene encoding the Bax peptide, and transducing the gene into an in vivo gene transduction vector having a switching-expression system. A strong tumor-inhibiting effect is obtained by infecting the topical tumor site with the expression vector.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2002-355034
(P2002-355034A)

(43) 公開日 平成14年12月10日 (2002. 12. 10)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームト* (参考)
C 1 2 N 15/09		A 6 1 K 35/76	4 B 0 2 4
A 6 1 K 35/76		A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 4
38/00		C 1 2 N 15/00	A 4 C 0 8 7
A 6 1 P 35/00		A 6 1 K 37/02	

審査請求 未請求 請求項の数12 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2001-133334(P2001-133334)

(22) 出願日 平成13年4月27日 (2001. 4. 27)

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 貫和 敏博

宮城県仙台市青葉区国見ヶ丘2-22-1

(74) 代理人 100107984

弁理士 廣田 雅紀

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改変型B a x ペプチド発現ベクター

(57) 【要約】

【課題】 改変型Baxペプチドを発現するベクターを構築し、改変型Baxペプチドをコードする遺伝子を生体内腫瘍細胞に導入することにより、該発現ベクターを用いて腫瘍細胞の増殖を抑制する方法を提供すること。

【解決手段】 Baxペプチドをコードする遺伝子からB H 3 領域を削除した改変型Baxペプチドをコードする遺伝子を作製し、これをスイッチング発現システムを有する生体内遺伝子導入ベクターに導入して発現ベクターを構築した。該発現ベクターを生体内腫瘍局所に感染させて、強力な腫瘍増殖抑制効果を得た。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 改変型Baxペプチドをコードする遺伝子を、生体内遺伝子導入ベクターに導入したことを特徴とする改変型Baxペプチド発現ベクター。

【請求項2】 生体内遺伝子導入ベクターが、スイッチング発現システムを有するベクターであることを特徴とする請求項1記載の改変型Baxペプチド発現ベクター。

【請求項3】 スwitching発現システムを有する生体内遺伝子導入ベクターが、Cre/loxP制御システムを有するベクターであることを特徴とする請求項2記載の改変型Baxペプチド発現ベクター。

【請求項4】 生体内遺伝子導入ベクターが、アデノウイルスベクターである請求項1乃至3のいずれかに記載の改変型Baxペプチド発現ベクター。

【請求項5】 改変型Baxペプチドをコードする遺伝子が、Bax遺伝子がコードするペプチドのうち、アポトーシス抑制蛋白と結合するBH3領域を除去したものであることを特徴とする請求項1乃至4のいずれかに記載の改変型Baxペプチド発現ベクター。

【請求項6】 改変型Baxペプチドをコードする遺伝子が、Bax遺伝子がコードするペプチドの112乃至192番目のアミノ酸配列をコードする遺伝子である請求項1乃至5のいずれかに記載の改変型Baxペプチド発現ベクター。

【請求項7】 改変型Baxペプチドをコードする遺伝子を、生体内遺伝子導入ベクターに導入することを特徴とする請求項1乃至6のいずれかに記載の改変型Baxペプチド発現ベクターの構築方法。

【請求項8】 生体内遺伝子導入ベクターが、スイッチング発現システムを有するベクターであることを特徴とする請求項7に記載の改変型Baxペプチド発現ベクターの構築方法。

【請求項9】 スwitching発現システムを有する生体内遺伝子導入ベクターが、Cre/loxP制御システムを有するベクターであることを特徴とする請求項8記載の改変型Baxペプチド発現ベクターの構築方法。

【請求項10】 生体内遺伝子導入ベクターが、アデノウイルスベクターである請求項7乃至9のいずれかに記載の改変型Baxペプチド発現ベクターの構築方法。

【請求項11】 請求項1乃至6のいずれかに記載の改変型Baxペプチド発現ベクターを腫瘍細胞に感染させ、発現させることにより、腫瘍細胞死を惹起することを特徴とする腫瘍細胞増殖抑制方法。

【請求項12】 腫瘍細胞が生体内腫瘍局所である請求項11記載の腫瘍細胞増殖抑制方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、細胞死（アポトーシス）誘導活性を有するペプチドの発現ベクター、特に強力なアポトーシスを惹起する改変型Baxペプチドの発

現ベクター、その構築方法及びそれを用いた生体内（インビボ）での抗腫瘍治療に関する。

【0002】

【従来の技術】細胞死（アポトーシス）誘導遺伝子導入は抗腫瘍治療の有望な方法である。アポトーシスはプログラムされた細胞死であり、細胞又は組織を取り囲んでいる環境下からの様々な刺激に対しての壊死や生理学的または病理的応答と区別される（Br. J. Cancer 26, 239-245, 1972; Intern. Rev. Cytol. 68, 251-306, 1980; Cancer Metastasis Reviews 11, 95-103, 1992）。細胞死の状況では、アポトーシスか、ネクローシスカ区別できない場合がある。現在、アデノウイルスによるp53遺伝子導入は海外・国内で肺癌を対象に臨床試験が実施されている。しかし最近その有効性の限界を示唆する報告がなされている（Cell 91, 325-334, 1997）。上記p53に発現制御されるBax遺伝子は強力なアポトーシス誘導遺伝子であり、その強発現による細胞死誘導は有力な次世代の遺伝子治療として注目されている。

【0003】アポトーシスは、生理的条件下で細胞自らが積極的にひき起こす細胞死であり、その形態は細胞核の染色体凝集、細胞核の断片化、細胞表面微絨毛の消失、細胞質の凝縮を特徴とし、最近では、アポトーシスを誘導する細胞表面受容体Fas抗原、アポトーシス誘導に必須のプロテアーゼ（カスパーゼ）、アポトーシスを抑制するがん遺伝子Bcl-2遺伝子などが明らかにされている。

【0004】がん遺伝子Bcl-2遺伝子は、濾胞性リンパ腫附随の染色体転座t(14;18)(q21;q32)により活性化されるがん遺伝子として同定され、アポトーシス抑制機能を有するユニークながん遺伝子であり、このBcl-2に相同性を示す多数のタンパク質はBcl-2ファミリーと呼ばれ、Bcl-2ファミリーには、Bcl-2やBcl-XLで代表されるアポトーシス抑制機能を有するメンバーと、BaxやBakで代表されるアポトーシス促進（又は誘導）機能を有するメンバーが存在することが知られている。

【0005】一方、ミトコンドリアがアポトーシスシグナルの形質導入におけるきわめて重要な役割を果たし、このミトコンドリアのアポトーシス変化をBcl-2ファミリータンパク質が調節し、アポトーシス抑制機能を有するBcl-2及びBcl-XLがミトコンドリア膜電位($\Delta\Psi$)ロス及びシトクロムCリリースを阻害すること（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14681-14686, 1998; J. Exp. Med. 183, 1533-1544, 1996; Cell 91, 627-637, 1997; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1455-1459）や、アポトーシス促進機能を有するBax及びBakがミトコンドリア膜電位($\Delta\Psi$)ロス及びシトクロムCリリースを誘導すること（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 4997-5002, 1998; J. Cell Biol. 143, 217-224, 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 14681-14686, 1998）も知られて

いる。

【0006】ミトコンドリアの細胞膜の透過性は、細胞死にいたるプロセスにおいてきわめて重要であることが知られている。Bcl-2の抗細胞死作用に打ち勝つための、細胞膜透過性を利用した治療法は、抗ガン治療の新しい標的として期待されている。Bcl-2ファミリーのプロアポトーシス因子の1つであるBaxの過剰発現は、細胞死をもたらす。Baxは通常細胞質に存在し、アポトーシスの刺激に反応してミトコンドリアへと移動する。また、Baxの孔形成性ドメインは、ミトコンドリアの移動を規制し、イオン伝導チャネルを形成する。

【0007】Baxは、アポトーシス調節因子であるBcl-2ファミリーと相同性の高い領域（BH1、BH2、BH3）を持っており、Bcl-2やBcl-XLとヘテロダイマー、或いはBaxとホモダイマーを形成する（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 91, 9238-9242, 1994, J. Biol. Chem. 270, 11962-11969, 1995）。Bcl-2とBcl-XLにおいて、BH1とBH2はホモ二量体形成またはヘテロ二量体形成のために必要だが、BaxではBH1とBH2ではなくBH3が、Bcl-2やBcl-XLやBcl-2ファミリー以外のアンチアポトーシスメンバーとのヘテロ二量体形成に重要であることが報告されている（Nature 369, 321-323, 1994, J. Biol. Chem. 271, 7440-7444, 1996, J. Biol. Chem. 271, 8521-8524, 1996）。

【0008】アポトーシス誘導遺伝子の導入は、抗腫瘍治療の有望な方法であるが、近年癌細胞ではBax蛋白の細胞死誘導に対して拮抗作用を有する蛋白（Bcl-2、Bcl-XLなど複数）が強発現する報告があり、その有効性には限界が予想されている。BaxはBH3と呼ばれる領域を介し、Bcl-2などのアポトーシス拮抗作用のある蛋白と結合する。従って、本発明者らは、この領域を遺伝子工学的に削除すれば、かかる拮抗蛋白の阻害を受けることなく癌細胞死誘導を惹起すると予測し、Baxをコードする遺伝子からBH3領域を切除した遺伝子を構築した。即ち、N末端あるいはC末端を切りとった一連の切断Baxのうち、BH3を持たないBaxの孔形成ドメインに相当する改変型delta N bax 112-192を構築し、該遺伝子コードする蛋白が、哺乳細胞及びE.coliを死に致らしめることを報告した（BBRC, 243, 609-616, 1998）。一方、該改変型Baxによるアポトーシス活性は、E.coli (in vitro) についての報告はなされていたが、生体内腫瘍細胞 (in vivo) における腫瘍増殖抑制効果については知られていなかった。

【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、改変型Baxペプチドをコードする遺伝子を生体内腫瘍細胞に導入することにより、改変型Baxペプチドを発現するベクターを構築し、該発現ベクターを用いて腫瘍細胞の増殖を抑制する方法を提供することにある。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、Baxペプチドをコードする遺伝子からBH3領域を除去した改変型Baxペプチドをコードする遺伝子を作製し、これをスイッチング発現システムを有する生体内遺伝子導入ベクターに導入して発現ベクターを構築し、該発現ベクターを生体内腫瘍局所に感染させたところ、強力な腫瘍増殖抑制活性を示すことを見出し、本発明を完成するに至った。スイッチング発現システムを有する生体内遺伝子導入ベクターとしては、好ましくはCre/loxP制御システムを有するベクターが使用される。

【0011】すなわち本発明は、改変型Baxペプチドをコードする遺伝子を、生体内遺伝子導入ベクターに導入したことを特徴とする改変型Baxペプチド発現ベクター（請求項1）や、生体内遺伝子導入ベクターが、スイッチング発現システムを有するベクターであることを特徴とする請求項1記載の改変型Baxペプチド発現ベクター（請求項2）や、スイッチング発現システムを有する生体内遺伝子導入ベクターが、Cre/loxP制御システムを有するベクターであることを特徴とする請求項2記載の改変型Baxペプチド発現ベクター（請求項3）や、生体内遺伝子導入ベクターが、アデノウイルスベクターである請求項1乃至3のいずれかに記載の改変型Baxペプチド発現ベクター（請求項4）や、改変型Baxペプチドをコードする遺伝子が、Bax遺伝子がコードするペプチドのうち、アポトーシス抑制蛋白と結合するBH3領域を除去したものであることを特徴とする請求項1乃至4のいずれかに記載の改変型Baxペプチド発現ベクター（請求項5）や、改変型Baxペプチドをコードする遺伝子が、Bax遺伝子がコードするペプチドの112乃至192番目のアミノ酸配列をコードする遺伝子である請求項1乃至5のいずれかに記載の改変型Baxペプチド発現ベクター（請求項6）や、改変型Baxペプチドをコードする遺伝子を、生体内遺伝子導入ベクターに導入することを特徴とする請求項1乃至6のいずれかに記載の改変型Baxペプチド発現ベクターの構築方法（請求項7）や、生体内遺伝子導入ベクターが、スイッチング発現システムを有するベクターであることを特徴とする請求項7に記載の改変型Baxペプチド発現ベクターの構築方法（請求項8）や、スイッチング発現システムを有する生体内遺伝子導入ベクターが、Cre/loxP制御システムを有するベクターであることを特徴とする請求項8記載の改変型Baxペプチド発現ベクターの構築方法（請求項9）や、生体内遺伝子導入ベクターが、アデノウイルスベクターである請求項7乃至9のいずれかに記載の改変型Baxペプチド発現ベクターの構築方法（請求項10）や、請求項1乃至6のいずれかに記載の改変型Baxペプチド発現ベクターを腫瘍細胞に感染させ、発現させることにより、腫瘍細胞死を惹起することを特徴とする腫瘍細胞増殖抑制方法（請求項11）や、腫瘍細胞が生体内腫瘍局所である請求項11記載の腫瘍細胞増殖抑制方法（請求項1

2)に関する。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明では、まず改変型Baxペプチドをコードする遺伝子を構築する。改変型Baxペプチドをコードする遺伝子としては、Baxペプチドがアポトーシス抑制蛋白と結合するBH3領域を除去したものであり、好ましくはBax遺伝子がコードするペプチドの112乃至192番目のアミノ酸配列をコードする遺伝子（改変型deltaN Bax遺伝子）に相当するものが使用される。遺伝子の構築には、通常の遺伝子工学的手法を用いることができる。本発明の改変型Baxペプチド発現ベクターを構築するために使用される生体内遺伝子導入ベクターとしては、アデノウイルス、レトロウイルス、SV40のようなパポウイルス、ワクシニアウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス等のウイルス由来のベクターを具体的に挙げるができるがこれらに限定されるものではなく、また、本発明のスイッチング発現システムとしては、Cre/loxP制御システム（J.Mol.Biol.150,467-486,1981）や酵母サッカロミセス・セレビシェのFLP/FRT組換えシステム（J.Mol.Biol.284,363-384,1998）などを具体的に挙げるができるがこれらに限定されるものでもない。本発明において構築した発現ベクターを生体内の腫瘍細胞に感染させ、発現することにより、高い腫瘍細胞の増殖抑制を得ることができる。

【0013】

【実施例】以下に、実施例を掲げてこの発明を更に具体的に説明するが、この発明の範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

実施例1（改変型Bax及びBax発現ベクターの作製）

改変型Bax（DeltaN Bax）及びBaxを導入した発現ベクター（図1）は、スイッチング発現システムCre/loxPを用いたアデノウイルスベクターに、改変型Bax又はBaxを組み込むことにより構築した（図2）。上記組換えアデノウイルスベクターは、アデノウイルスCre-loxPキット（タカラバイオメディカル社製）を用いて作製した。すなわち、CAGプロモーター、2つのloxP部位の間にあるstuffer遺伝子、SwaIクローニングサイト、及びG polYAから構成されているコスミドベクターpAxCALNLwのSwaI部位に、Bax cDNA（pEF-Bax, BBRC 243, 609-616, 1998のXbaI断片）又は改変型Bax cDNA（Bax 112-192, pEF-Bax, BBRC, 243, 609-616, 1998のEcoRI断片）を挿入した。その後、製造者の指示に基づいたCOST-TPC法により、上記Bax cDNA又は改変型Bax cDNAを有するコスミドベクターから改変型Bax（AxCALNBax）及びBaxの発現ベクター（AxCALNdeltaNBax）を作製した。

【0014】実施例2（肺ガンにおける改変型Baxと野生型Baxの発現の解析）

以下の実施例に用いた全てのアデノウイルスは、パッケージング293細胞を塩化セシウム密度勾配による遠心分離を2回行うことにより精製し、透析をかけることに

よって調製した。各ウイルスベクターのウイルス価はA260nmの吸光度で溶解したウイルスを測定した後、ブランク法により定量した。かかるウイルス価はpfu（plaque-forming units）/mlで表した。また、上記のウイルス調製物がE1+アデノウイルスで汚染されていないことをPCR法によって確認した。

【0015】アデノウイルスベクターで感染させる1日前にあらかじめ、10%の熱不活性ウシ胎児血清及び抗生物質を添加した、ダルベッコ改変イーグル培地又はRPMI培地で単層培養したヒト非小細胞肺癌細胞（H1299細胞又はA549細胞）を、10moiのAd.CALN.LacZ（LacZ）、Ad.CALN.Bax（Bax）あるいはAd.CALN.DeltaN（deltaN）と、3moiのAd.CAN.Creとを用いて感染させた。感染から24時間後、48時間後、72時間後に各感染細胞を、放射線免疫沈降分析の緩衝液（10mMのトリス〔pH7.4〕、150mMのNaCl、1%のトリトンX-100、0.5%のdeoxycholate、0.1%のSDS、5mMのEDTA、及びプロテアーゼ阻害剤）に溶解し、各細胞溶解物（試料あたり20μgの可溶性蛋白質）を10～20%のポリアクリルアミドトリス-グリシニングル（Invitrogen社製）にのせて分離し、フッ化ポリビニリデン膜にブロットした。かかるブロット膜を10%の無脂肪乳を含むTris-buffered salineでブロッキングした後、マウス抗ヒトBcl-2モノクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology社製）、マウス抗ヒトBcl-XLモノクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology社製）、又はウサギ抗ヒトBaxポリクローナル抗体（Oncogene社製）を用いて4℃で一晩インキュベートし、続いて西洋ワサビペルオキシダーゼが結合した、ヒツジ抗マウス免疫グロブリン抗体又はロバ抗ウサギ免疫グロブリン抗体（Amersham Pharmacia Biotech社製）を用いて室温で1時間インキュベートした。その後、ECLキット（Amersham Pharmacia Biotech社製）を用いて化学ルミネセンス検出し、ボラロイド（登録商標）カメラで撮影した。その結果を図3に示す。

【0016】上記の結果、改変型Bax（deltaN）と野生型Bax（Bax）の発現は感染後48時間と72時間後の細胞溶解物で観察でき、Baxの通常の発現レベルはH1299細胞よりA549細胞の方が高かった。A549細胞ではBcl-2もBcl-XLも検出できた。H1299細胞ではBcl-2は検出できなかった。A549細胞ではBaxを過剰発現してもBcl-2及びBcl-XLの発現レベルは変化しなかったが、H1299細胞ではDeltaN Baxの過剰発現によりBcl-2が誘導されていた。しかし、DeltaN Baxを過剰発現してもBcl-XLは変化しなかった。これに対して、DeltaN Baxを過剰発現させてもA549細胞やH1299細胞におけるBcl-2とBcl-XLの発現レベルは変化しなかった。

【0017】実施例3（改変型Bax又はBaxの過剰発現による効果）

Bax又はDeltaN Baxの過剰発現による細胞傷害性を評価

するため、実施例2記載の単層培養した肺ガン細胞（H1299細胞又はA549細胞）を、図4に示される各多重感染度（MOI：p.f.u./細胞）のAdCALNBax（Bax）、AdCALNdeltaNBax（DeltaNBax）、又はAdCALNLZ（LacZ）で感染させ、その後アデノウィルスを誘導するために1/3の多重感染度のAxCANCreを感染させた。感染から96時間後、Alamar blue（BIOSOURCE社製）を用いたカラーメトリックアッセイを製造者のプロトコルに準じて行い、細胞の生存能力を測定した。その結果を図4に示す。なお、各値は少なくとも3回以上の実験から求めたものである。これらの結果から、DeltaNBaxの発現は野生型Baxのものとは比べて肺ガンの細胞死を3倍高く引き起こしていた（A549細胞の場合；BaxのIC₅₀は10m.o.i、DeltaNBaxのIC₅₀は3m.o.i、 $p < 0.05$ 、H1299細胞の場合；BaxのIC₅₀は20m.o.i、DeltaNBaxのIC₅₀は6m.o.i、 $p < 0.05$ ）。

【0018】実施例4（癌細胞死におけるDeltaNBax又はBax発現の効果）

DeltaNBax又はBaxを発現させることによるA549細胞の形態変化、及びミトコンドリア細胞膜電位について解析を行った。8個のLab-Tek II Chamber Slideのウェル（Nalge Nunc International社製）中に10%のウシ胎児血清を添加したダルベッコ改変イーグル培地500μlを入れてA549細胞を培養し、翌日、10m.o.iのAd.CALN.deltaNBax（deltaNBax）、Ad.CALN.Bax（Bax）、又はAd.CALN.LacZ（LacZ）と、3m.o.iのAd.CAN.Creとを感染させた。感染から48時間後、細胞をPBSで洗浄して氷温のメタノールで固定し、25μg/mlのHoechst33258（核染色剤）又は5μg/mlのpropidium iodide（PI：死細胞染色蛍光色素）で染色し、かかる細胞の核クロマチンを視覚化した。さらに、MitoCaptureTMミトコンドリアのアポトーシス検出キット（MBL社製）を用いてミトコンドリア細胞膜電位を視覚的に検出し、蛍光顕微鏡により400倍の倍率で観察した（図5）。これらの結果から、DeltaNBaxを過剰発現させた細胞では細胞死のパターンが野生型Baxと異なるパターンを示した。ガン細胞死を引き起こすBaxを過剰発現した細胞では、染色体凝集、細胞核の断片化、アポトーシス小胞体のようなアポトーシスが促進しているのに対して、ガン細胞死を引き起こすDeltaNBaxでは特にこれらの所見に乏しかった。

【0019】実施例5（DeltaNBax又はBax発現細胞におけるカスパーゼ活性の解析）

Baxを過剰発現させることにより、カスパーゼ-9活性を引き起こすミトコンドリアからシトクロムCを離脱させることが知られている（Nature, 391, 496-499, 1998; Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 4997-5002, 1998）。そこでBax又はDeltaNBaxを発現させ、細胞におけるカスパーゼ活性の解析を行った。細胞溶解物中のカスパーゼ-3様プロテアーゼ活性は、CaspACEアッセイシ

ステムキット（ProMega）を、また、細胞溶解物中のカスパーゼ-8及びカスパーゼ-9様プロテアーゼ活性は、MBLキット（日本国、Medical Biological Laboratories）を用いて測定した。A549細胞又はH1299細胞に、20m.o.iのAd.CALN.LacZ（LacZ）、Ad.CALN.Bax（Bax）、又はAd.CALN.deltaNBax（deltaNBax）と、6m.o.iのAd.CAN.Creとを感染させ、48時間後各細胞を前記緩衝液で溶解し、4℃で20分間、14000rpmの遠心分離を行った。得られた各試料あたり100μgの可溶性細胞質ソル蛋白質を、200μMのカスパーゼ-3特異基質DEVD-pNA、カスパーゼ-9特異基質LEHD-pNA（MBL社製）、又はカスパーゼ-8特異基質IETD-pNAを混合し、37℃でインキュベートした。その後、それぞれの基質から分離したpNAを光度計（SPECTRAMax 340 microplate reader）を用いて405nmでモニターし、SOFmax PROソフトウェア（Molecular Devices社製）を使用して分析した。その結果を図6に示す。なお、何も感染させていないA549細胞又はH1299細胞をコントロールとした。この結果から、Baxを発現させたA549細胞においてはカスパーゼ-3、-8、及び-9の活性を誘導し、H1299細胞においてカスパーゼ-3及び-9の活性を誘導することが確認できた。これらBaxのカスパーゼ活性を誘導する強さを比較すると、DeltaNBaxを発現させた両方のガン細胞においてはかかる活性が弱かった。

【0020】実施例6（DeltaNBax又はBaxの発現によるガン細胞死に対するカスパーゼ阻害剤の効果）

カスパーゼの阻害剤であるz-VAD-fmkを用いることによって、DeltaNBax又はBaxを発現させたガン細胞において細胞死の抑制に違いがどうかを調べてみた。感染させる24時間前に、最終濃度で50μMのz-VAD-fmkの存在下又は非存在下で、200μlのDMEM（10%のFCSを添加）にA549細胞（1×10⁵）を播き、96ウェルプレート中で24時間インキュベーションした。24時間後、かかる細胞を20m.o.iのAd.CALN.deltaNBax、Ad.CALN.Bax、又はAd.CALN.LacZで感染させ、その後1/3のm.o.iのAxCANCreで感染させた。感染から72時間後に細胞の生存能力を実施例3と同様の方法により測定した。その結果を図7に示す。なお、何も感染させていないA549細胞をコントロールとした。カスパーゼ-3様プロテアーゼの阻害因子であるzVADfmkは、Baxがガン細胞死を完全に抑制するのに対し、DeltaNBaxでは誘導されるガン細胞死を抑制しないことがわかった。

【0021】実施例7（インビボにおけるDeltaNBax又はBax発現に対する腫瘍増殖抑制効果の解析）

6～8週齢のBalb/c nu/nu マウスの背部側面に5×10⁵のA549細胞を皮下接種し、腫瘍の直径が約0.3～0.5cmになった時、各マウスに1×10⁵p.f.u.のAdCALNLZ（▲）、AdCALNBax（○）、若しくはAdCALNdeltaNBax（●）と、AdCANCreとを3：1の割合で混合した

もの、又はPBSのみ(■)を100 μ lずつ腫瘍内に3回投与し、図8に示される投与後の日数に腫瘍の体積を測定した。かかる測定は反復測定モジュールを備えたANOVAを用いて少なくとも5匹のマウスで繰返し行い、測定値を統計ソフト(StatView社製)を用いたANOVAにより決定し、グループ間の違いをStudent's t-testにより求め、平均 \pm SE(P<0.05は有意)で図8に示した。なお、上記腫瘍の体積はa(長径) \times b²(短径) \times 0.5で求めた。この結果から、A549細胞による皮下腫瘍へのDeltaN Bax発現アデノウィルスベクター(●)の腫瘍内投与は、LacZを発現するアデノウィルスベクター(▲; n=5, p<0.03)のもの比べて、5週間で腫瘍の増殖が26%に抑えられていた。また、DeltaN Baxを発現するアデノウィルスベクター(●)を投与したものは、Baxを発現するアデノウィルスベクター(○)を投与したものの75%(n=5)の腫瘍増殖を示した。

【0022】

【発明の効果】本発明の改変型Baxペプチド発現ベクターは、これを生体内腫瘍局所に感染させ、発現させることにより、従来にない高い腫瘍増殖抑制効果を得ることができる。動物実験レベルではBax遺伝子を導入した場合の効果について報告されているが、その腫瘍抑制効果は一時的なものであり(Cancer Res. 60, 1157-1161, 2000)、本発明において、改変型Bax遺伝子ペプチド発現ベクターを構築し、Bax遺伝子と比較したところ、改変 *

*型Bax遺伝子導入マウス腫瘍モデルではほぼ腫瘍を完全に抑制する成績を得た。その機構は既報の細胞死経路とは異なる可能性があり、in vivoで斬新な効果を示したと考えられる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のベクター作製に用いたDeltaN Bax遺伝子及び野生型Bax遺伝子の構造を示す図である。

【図2】本発明のDeltaN Bax遺伝子発現ベクター及び野生型Bax遺伝子発現ベクターの構築図を示す図である。

10 【図3】A549細胞又はH1299細胞におけるDeltaN BaxとBaxとの発現を示す図である。

【図4】DeltaN Bax、Bax、又はLacZ発現ベクターを導入した、A549細胞又はH1299細胞の生存結果を示す図である。

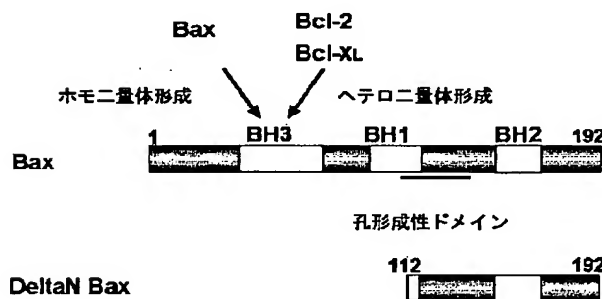
【図5】DeltaN Bax、Bax、又はLacZ発現ベクターを導入したA549細胞における核クロマチン形態及びミトコンドリア膜電位による細胞死の視覚化を示す図である。

20 【図6】DeltaN Bax、Bax、又はLacZ発現ベクターを導入した、A549細胞又はH1299細胞におけるカスパーゼ様プロテアーゼ活性の結果を示す図である。

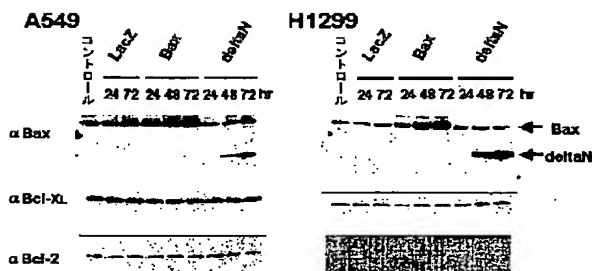
【図7】DeltaN Bax、Bax、又はLacZ発現ベクターを導入したA549細胞におけるカスパーゼ3様プロテアーゼ活性の阻害効果を示す図である。

【図8】インビボにおけるDeltaN Bax又はBax発現に対する腫瘍増殖抑制効果の結果を示す図である。

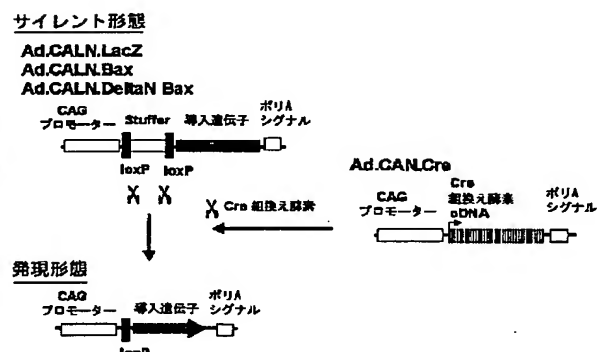
【図1】



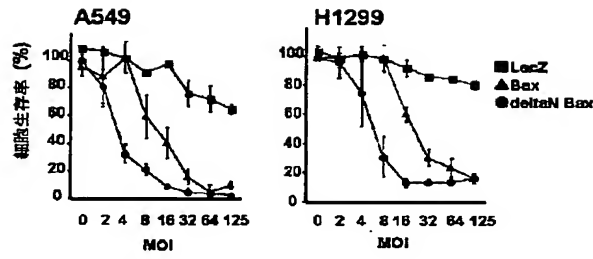
【図3】



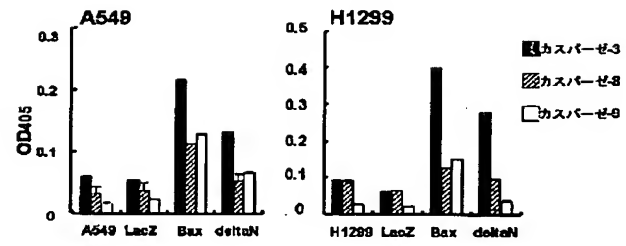
【図2】



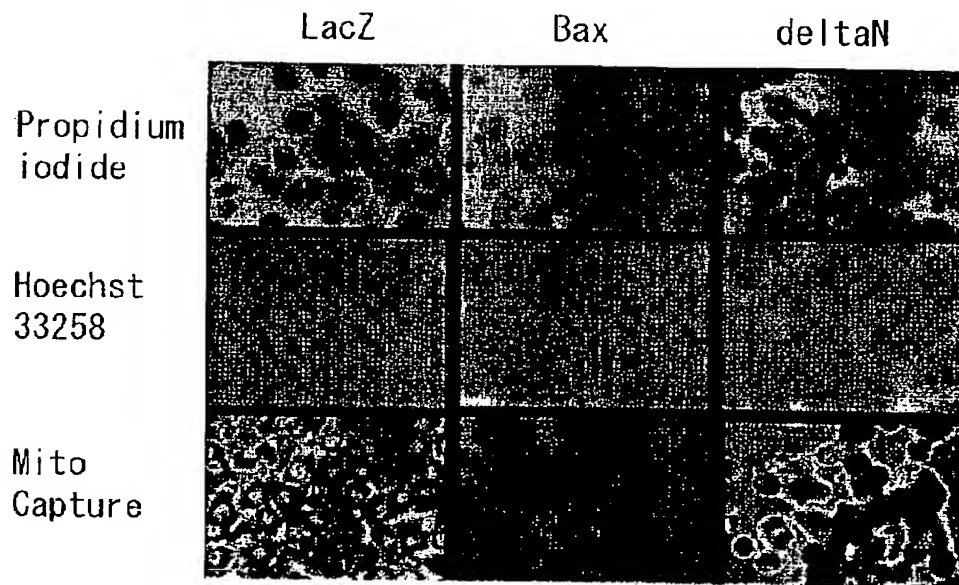
【図4】



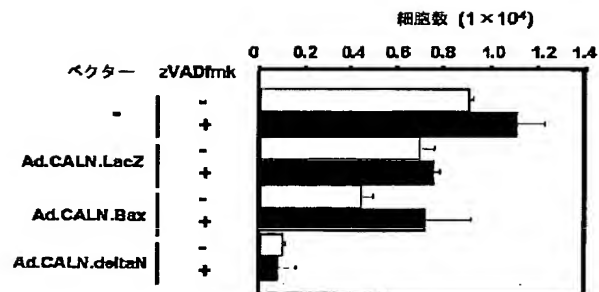
【図6】



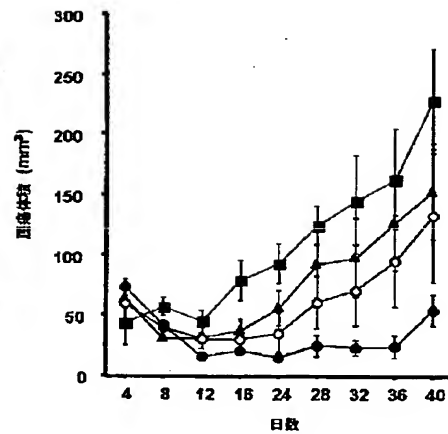
【図5】



【図7】



【図8】



フロントページの続き

(72)発明者 臼井 一裕
宮城県仙台市青葉区柏木 1 - 4 - 25 - 205
(72)発明者 太田 成男
東京都町田市本町田1754-35

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA80 CA04 DA02 DA03
EA02 EA04 FA02 FA20 GA11
HA17
4C084 AA02 BA44 NA14 ZB26
4C087 AA01 AA02 BC83 NA14 ZB26